

## モルモット膀胱単一平滑筋細胞の $\text{Ca}^{2+}$ 電流にみられる カフェインの抑制作用

松 藤 弥 生   吉 野 正 巳

札幌医科大学医学部生理学第1講座 (主任 藪 英世 教授)

The inhibitory effect of caffeine on  $\text{Ca}^{2+}$  currents in isolated single  
smooth muscle cells of the guinea-pig urinary bladder

Yayoi MATSUFUJI and Masami YOSHINO

*Department of Physiology (section I), School of Medicine, Sapporo Medical University*  
(Chief : Prof. H. YABU)

**ABSTRACT** The inhibitory effect of caffeine on inward  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{Ca}}$ ) was investigated in isolated single smooth muscle cells of the guinea-pig urinary bladder using the whole-cell patch clamp technique.

(1) The inhibition of  $I_{\text{Ca}}$  induced by caffeine was found to occur in a biphasic manner under repetitive depolarizations at a frequency of 1 Hz. The initial transient inhibition of  $I_{\text{Ca}}$  was eliminated by inclusion of 20 mM EGTA or both 10 mM procaine and 1.0 mg/ml heparin in the pipette solution, but the sustained inhibition of  $I_{\text{Ca}}$  was unaffected by these agents. These results suggested that the initial transient inhibition of  $I_{\text{Ca}}$  was due to an increase in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, while the sustained component of  $I_{\text{Ca}}$  inhibition was independent of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ .

The following results were obtained with regard to the sustained component of  $I_{\text{Ca}}$  :

(2) Caffeine reduced  $I_{\text{Ca}}$  without any modification of the threshold or reversal potentials, suggesting that caffeine decreased the conductance of the  $\text{Ca}^{2+}$  channel.

(3) Caffeine inhibited  $I_{\text{Ca}}$  in a time-dependent manner and not in a use-dependent manner. The concentration dependence of the  $I_{\text{Ca}}$  inhibition indicated one-to-one binding stoichiometry for the currents; the dissociation constant was 20 mM.

(4) Caffeine did not alter the steady-state activation of  $I_{\text{Ca}}$  but caused a hyperpolarizing shift in the steady-state inactivation curve. This result suggested that the sustained component of  $I_{\text{Ca}}$  inhibition was presumably due to direct inhibition of  $I_{\text{Ca}}$  through preferential binding of caffeine to the  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the inactivated state.

(5) 100  $\mu\text{M}$  8-bromo cyclic adenosine monophosphate (8-bromo cAMP) did not inhibit  $I_{\text{Ca}}$  and produced little shift in the steady-state inactivation curve. These results suggested that the inhibitory effect of caffeine on  $I_{\text{Ca}}$  was not attributable to the inhibition of phosphodiesterase activity which leads to an accumulation of cAMP.

From the above results, it appears that initial transient inhibition of  $I_{\text{Ca}}$  induced by caffeine is due to the  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated inactivation of  $I_{\text{Ca}}$  caused by stored  $\text{Ca}^{2+}$  release. The sustained component of  $I_{\text{Ca}}$  inhibition is presumably due to the direct inhibition of  $I_{\text{Ca}}$  through preferential binding of caffeine to the inactivated state of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

(Received July 2, 1993 and accepted July 16, 1993)

**Key words:**  $\text{Ca}^{2+}$  channel currents, Whole-cell patch clamp, Caffeine, Single smooth muscle cells, Urinary bladder

## 1 緒 言

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は、種々の細胞の生理機能の発現に重要な役割を果たしていることが知られている。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇には、形質膜に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを介する細胞外液からの流入と、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離が関与すると考えられている。後者には、アゴニスト刺激により誘発される  $\text{IP}_3$  誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構 (IICR) と、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が引き金になり  $\text{Ca}^{2+}$  が遊離される  $\text{Ca}^{2+}$  誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構 (CICR) が知られている<sup>1,2)</sup>。近年、カフェインは CICR 機構を特異的に促進して細胞内貯蔵部位から  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を引き起こす事が示され<sup>2)</sup>、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態と細胞機能との関連を研究するための薬理学的手法として利用されるようになった。平滑筋細胞において、カフェインは CICR 機構を促進<sup>3)</sup> して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させ、 $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{K}^+$  チャネル<sup>4,5)</sup> や  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{Cl}^-$  チャネル<sup>6)</sup> を活性化する一方、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを  $\text{Ca}^{2+}$  依存性不活性化によって抑制する<sup>7)</sup> ことが示されている。近年、カフェインは電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに対して、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性不活性化を介する抑制作用に加え、直接抑制作用を有することがモルモット単離小腸縦走筋細胞 (Zholos ら<sup>7)</sup>, 1991)、妊娠ラット培養子宮平滑筋細胞 (Martin ら<sup>8)</sup>, 1989)、ウサギ耳動脈単離平滑筋細胞 (Hughes ら<sup>9)</sup>, 1990) で報告された。Martin ら<sup>8)</sup>、Hughes ら<sup>9)</sup> の研究によると、カフェインは使用依存性および電位依存性抑制を示さないことから、 $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの状態 (静止、活性化、不活性化の 3 状態) に無関係に電流を抑制すると結論している。しかしながらこの結論は、高濃度の  $\text{Ba}^{2+}$  を  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの担体に用いた非生理的実験条件下で得られたものであり、問題がある。Zholos ら<sup>7)</sup> は  $\text{Ca}^{2+}$  を担体として用いて、カフェインが細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に関係なく  $\text{Ca}^{2+}$  電流を抑制することを示しているが、その詳しい作用様式に関しては報告していない。本研究はカフェインの電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに対する抑制作用に着目し、モルモット膀胱体部から分離した単一平滑筋細胞に whole-cell patch clamp 法<sup>10)</sup> を適用し、カフェインの  $\text{Ca}^{2+}$  電流抑制機構について精査した。また、カフェインは、フォスフォジエステラーゼ阻害作用により、細胞内 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) を増加させることが知られている<sup>11)</sup>。よって、

カフェインの電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに対する抑制作用が cAMP に起因する可能性についても併せて検討した。

## 2 実験方法

### 2・1 実験材料

体重 300~600 g の雄モルモットを、頸椎脱臼後、頸動脈を切開して瀉血し、開腹して膀胱の左右尿管開口部より上方部分に横切開を加え膀胱を摘出した。

### 2・2 実験方法

#### 2・2・1 細胞分離

細胞分離は Kura ら<sup>12)</sup> の方法に準じて行った。摘出した膀胱を直ちに  $\text{Ca}^{2+}$ -free 修正 Tyrode 液 [135.0 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5.0 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid), 10 mM glucose, tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris) 用いて pH 7.4 に調整] 中で 37°C、約 15 分間インキュベートした。次に摘出した膀胱に縦切開を加え、翻転して内腔を露出し、実体顕鏡下で膀胱粘膜を注意深く剝離し、幅約 0.5 cm、長さ約 1 cm に裁断した後、再び  $\text{Ca}^{2+}$ -free 修正 Tyrode 液で約 15 分間インキュベートし、十分に弛緩させた。これを、0.3% collagenase, 0.05% pronase E, 35 units/ml elastase, 1% bovine albumin を含む  $\text{Ca}^{2+}$ -free 修正 Tyrode 液 2 ml 中で 37°C、15~30 分間スターラーで攪拌した。そこに 1% bovine albumin を含む  $\text{Ca}^{2+}$ -free 修正 Tyrode 液を加え全量 10 ml とした後、1000 r. p. m. で約 3 分間遠心した。沈殿した組織片を更に  $\text{Ca}^{2+}$ -free 修正 Tyrode 液 3 ml 中で 37°C、約 20 分間スターラーで攪拌し、細胞を分離した。細胞は修正 KB 液 (Klaftbrühe medium)<sup>13)</sup> [110.0 mM KOH, 70 mM glutamic acid, 10 mM taurine, 25 mM KCl, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 11 mM glucose, 5 mM HEPES, 0.5 mM glycoethyldiamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), HCl を用いて pH 7.4 に調整] 中で 4°C に保存し、6~10 時間実験に供した。

#### 2・2・2 パッチ電極及び電極溶液

パッチ電極はヘマトクリット管 (Capillary Tubes, Drummond Scientific Co.) をパッチ電極ブラー (PP-83, Narishige) で二段階に加熱牽引し、電極抵抗が 2~4 MΩ になるように作成した。

電極溶液は高セシウム溶液 [140 mM CsCl, 4 mM

$\text{Na}_2\text{ATP}$ , 5 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, Tris を用いて pH 7.4 に調整] を用い, EGTA 濃度は実験目的によっては, 20 mM を使用した. 電極液の充填は, ミリポアフィルター (孔径  $0.22\ \mu\text{m}$ ) を通し, 電極先端部を 2 ml のプラスチック容器に満たした電極液に浸した後, カテラン針を用いて電極後部より逆行性に行った. 不関電極本体には, 内径 5 mm のポリエチレンチューブを使用し, 電極内液には 1% の寒天で固めた 100 mM KCl を用いた.

### 2・2・3 実験装置

実験槽は, 底に穴を開けスライドガラスをはりつけた直径 35 mm の培養皿を, アクリル版にはめ込み作成した. これを倒立顕微鏡のステージにのせ, パスツールピペットで KB 液中より採取した分離細胞を滴下し, 細胞が底に付着するのを待って灌流し, 実験を開始した. 灌流液は, 修正 Tyrode 液 [135.0 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5.0 mM HEPES, 10 mM glucose, Tris を用いて pH 7.4 に調整] を用い, 点滴用チューブを通して実験槽に流し込み, 実験槽対側よりエアポンプを用い吸引, 流出させた. 液交換には約 2 秒要した. 実験は室温 (25°C 前後) で行った.

### 2・2・4 電流の記録

膜電流の記録は, パッチクランプ法の whole-cell clamp mode<sup>10)</sup> によって行った. パッチ電極をピペットホルダーに装着し, 5 mV の矩形波状の電圧パルスを与えながらパッチ電極を実験槽に入れ, 倒立顕微鏡下で 3 次元油圧式マニピュレーター (MO-202, Nari-shige) を操作し, 細胞表面に軽く電極をあて吸引し, ギガオーム ( $\text{G}\Omega$ ) シール状態を得た (cell attached patch mode). その後, さらに吸引しながら電圧パルスを与えて, ギガオームシールを保持しつつ膜を破り, whole-cell 状態とした. 膜容量と直列抵抗を補正した後, 電流の記録を開始した. 刺激条件のプログラム及び電流の記録は pCLAMP Version 5.5 (Axon Instruments Inc.) を用いて行った.

### 2・2・5 薬剤

使用した主な薬剤は以下のとおりである.

collagenase type 1 (Sigma Chemical Co. 以下 Sigma), pronase E (Serva), elastase (Sigma), bovine albumin (Sigma), anhydrous caffeine (和光純薬工業株式会社), procaine (Sigma), 8-bromo adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (8-bromo cAMP) (Sigma), glycoetherdiamine- $\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'$ -tetraacetic acid (EGTA) (同仁化学研

究所), 1,2-bis (2-aminophenoxy) ethane- $\text{N},\text{N},\text{N}',\text{N}'$ -tetraacetic acid (BAPTA) (同仁化学研究所)

## 3 成績

### 3・1 $\text{Ca}^{2+}$ 電流に対するカフェインの作用

外液に修正 Tyrode 液を灌流し, セシウム電極 (0.5 mM EGTA) を用いて  $\text{Ca}^{2+}$  電流を記録した. Fig. 1a は, 持続時間 300 ms, 0.067 Hz の脱分極刺激を, 保持電位  $-60\ \text{mV}$  から  $+60\ \text{mV}$  まで 10 mV ステップで与えて記録した電流トレースを重ね合わせたもの (コントロール) である. Fig. 1c (○) は, 横軸に与えた電

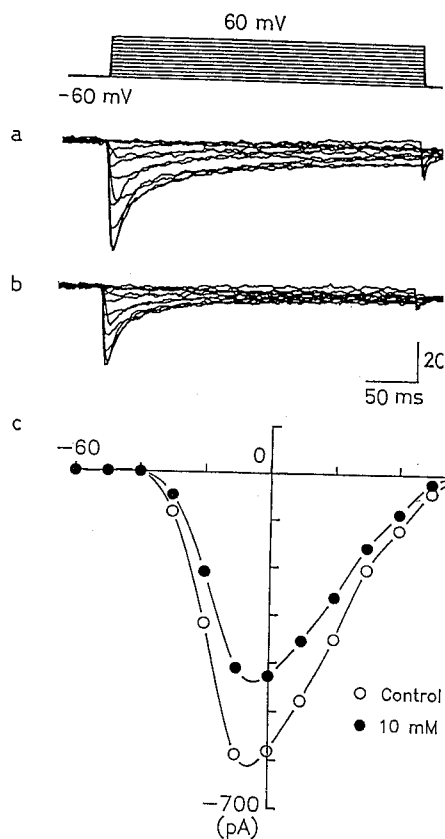


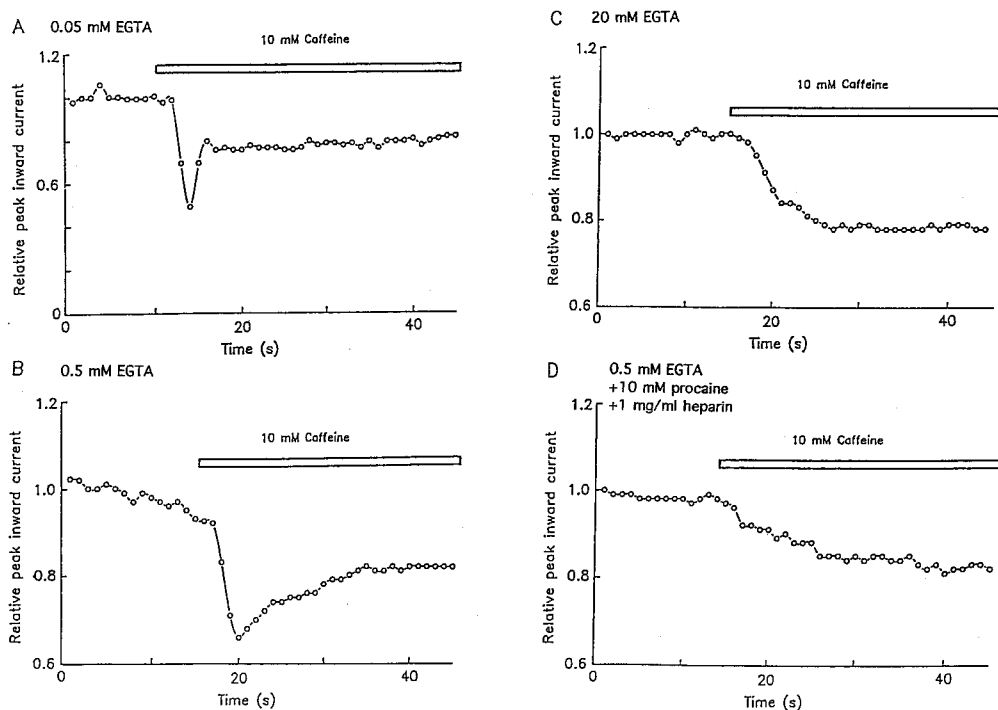
Fig. 1 Effect of caffeine (10 mM) on inward  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{\text{Ca}}$ ) in single isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. Superimposed current traces evoked by 300 ms depolarizing pulses by a 10 mV step to  $+60\ \text{mV}$  from a holding potential of  $-60\ \text{mV}$  before (a) and 3 min after (b) application of 10 mM caffeine to the external solution. c: Current-voltage relationship for the  $I_{\text{Ca}}$  in the absence (○) and in the presence (●) of 10 mM caffeine. Leak and capacitive currents have been subtracted.

圧、縦軸におおのの電圧における  $\text{Ca}^{2+}$  電流のピーク値をプロットした電流-電圧曲線を示す。電流-電圧曲線はU字型を示し、活性化閾値は $-40$  mV、ピーク値は $-10$  mV から  $0$  mV の間で、逆転電位は $+60$  mV 付近であった。外液にカフェイン ( $10$  mM) を投与し、3 分後に同一の刺激条件下で  $\text{Ca}^{2+}$  電流を記録した。Fig. 1b は、カフェイン投与下で記録した電流トレースを重ね合わせたものである。電流-電圧曲線上で (Fig. 1c ●)  $\text{Ca}^{2+}$  電流のピーク値は各膜電位で抑制され、カフェイン投与前 (Fig. 1c ○) と比較すると、閾値、ピーク値、逆転電位に変化はみれなかった。

### 3・2 カフェインによる $\text{Ca}^{2+}$ 電流抑制作用の時間経過

カフェインによる  $\text{Ca}^{2+}$  電流の抑制が、細胞内貯蔵部位からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇に起因するものかどうか調べた。保持電位 $-60$  mV から $+$

$10$  mV までの脱分極刺激を、持続時間  $15$  ms,  $1$  Hz の刺激頻度で繰り返し与え、カフェイン ( $10$  mM) 投与時にみられる  $\text{Ca}^{2+}$  電流の時間経過に伴う変化を観察した。細胞内の EGTA 濃度が  $0.05$  mM (Fig. 2A),  $0.5$  mM (Fig. 2B) の場合、投与直後に大きな一過性の抑制と、それに続く持続的抑制が観察された。そこで、細胞内 EGTA 濃度  $0.5$  mM に、 $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を阻止するプロカイン<sup>3)</sup> ( $10$  mM) とヘパリン ( $1$  mg/ml) を加え、同様に  $\text{Ca}^{2+}$  電流の変化を観察した。これにより、カフェイン投与直後にみられる一過性の抑制は消失し、持続的抑制のみがみられた (Fig. 2D)。この持続的抑制の抑制率は  $29.2 \pm 4.3\%$  で、 $0.5$  mM EGTA 単独の場合 ( $26.4 \pm 4.7\%$ ) と有意な差はなかった (Table 1)。細胞内の EGTA 濃度を  $20$  mM とし、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を抑えた条件下では、プロ



**Fig. 2** The time course of caffeine-induced inhibition of  $I_{\text{Ca}}$  with different internal solution during repetitive stimulation ( $15$  ms duration) at a frequency of  $1$  Hz from a holding potential of  $-60$  mV to  $+10$  mV.  $10$  mM caffeine was applied during the period indicated by the horizontal bar. The mean amplitude of the peak  $I_{\text{Ca}}$  before application of caffeine was normalized to  $1.0$ , and the peak amplitude relative to this was plotted against the time. **A:** Effect of caffeine on  $I_{\text{Ca}}$  when  $0.05$  mM EGTA was contained in internal solution. **B:**  $0.5$  mM EGTA was contained in internal solution. **C:**  $20$  mM EGTA was contained in internal solution. **D:**  $10$  mM procaine and  $1$  mg/ml heparin were added to internal solution contained  $0.5$  mM EGTA. Note the biphasic inhibition of  $I_{\text{Ca}}$  when internal solution contained  $0.05$  mM EGTA (**A**) and  $0.5$  mM EGTA (**B**). No initial transient inhibition of  $I_{\text{Ca}}$  by caffeine was observed in (**C**) and (**D**).

カインとヘパリンを加えた場合と同様に前半部の一過性の抑制は消失し、後半部の持続的抑制のみが観察され (Fig. 2C), 抑制率にも有意差はなかった (Table 1).

以下後半の持続性の抑制部分の抑制様式について調べた.

**Table 1** The degree of sustained component of  $I_{\text{Ca}}$  inhibition by 10 mM caffeine measured in various internal conditions as indicated in the table. The mean amplitude of the peak  $I_{\text{Ca}}$  before application of caffeine was normalized to 1.0. Each value is presented as the mean  $\pm$  S. E.,  $n$  = number of experiments.

Internal conditions	$I_{\text{Ca}}$ inhibition (%)
0.5 mM EGTA	$26.4 \pm 4.7$ ( $n=11$ )
20 mM EGTA	$24.6 \pm 3.5$ ( $n=9$ )
5 mM BAPTA	$28.7 \pm 3.7$ ( $n=8$ )
0.5 mM EGTA + 10 mM procaine + 1 mg/ml heparin	$29.2 \pm 4.3$ ( $n=4$ )

### 3.3 カフェイン作用の濃度依存性

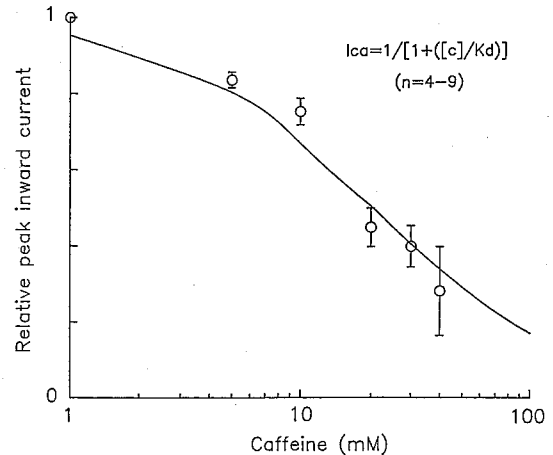
カフェイン投与後半部にみられる  $\text{Ca}^{2+}$  電流抑制の濃度依存性を調べた.  $-60$  mV から  $+10$  mV までの脱分極刺激を, 持続時間 150 ms, 0.067 Hz の刺激頻度で繰り返し与え, 外液に 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM 及び 50 mM のカフェインを投与したときの抑制率を算出した. カフェインの  $\text{Ca}^{2+}$  電流に対する抑制作用は濃度依存的であり,  $K_d$  は 20 mM であった (Fig. 3).

### 3.4 カフェイン作用の時間依存性

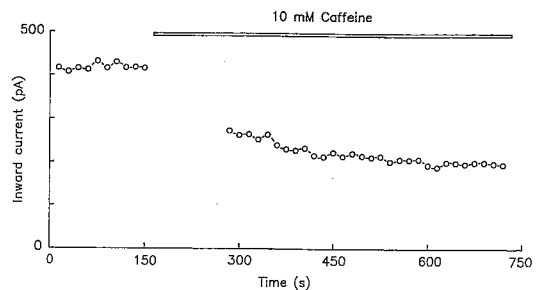
カフェインの抑制効果の時間依存性について調べた. 保持電位  $-60$  mV から  $+10$  mV までの脱分極刺激を, 持続時間 150 ms, 0.067 Hz の刺激頻度で繰り返し与えて  $\text{Ca}^{2+}$  電流を記録した. 一定の大きさの  $\text{Ca}^{2+}$  電流が記録されることを確認した後, 脱分極刺激を 2 分間中止し, この間, 外液にカフェイン 10 mM を投与した. 再び同様の脱分極刺激を与えて記録を再開したところ, カフェイン投与後の初発の刺激で 33% の抑制がみられた (Fig. 4). このことから, カフェインによる  $\text{Ca}^{2+}$  電流の抑制は主に時間依存性であり, 使用依存性は少ないことが判明した.

### 3.5 定常状態活性化曲線

カフェインの定常状態活性化曲線に対する影響を調べた. 持続時間 300 ms, 刺激頻度 0.067 Hz の脱分極刺激を, 保持電位  $-60$  mV から  $+60$  mV まで 10 mV ステップで与え,  $\text{Ca}^{2+}$  電流を記録した. 得られた電流



**Fig. 3** The dose-response relationship for the caffeine inhibition of  $I_{\text{Ca}}$ . Repetitive depolarizing pulses (150 ms duration) were applied at a frequency of 0.067 Hz from a holding potential of  $-60$  mV to  $+10$  mV. The mean amplitude of the peak  $I_{\text{Ca}}$  before application of caffeine was normalized to 1.0, and the peak amplitude of the maximum  $I_{\text{Ca}}$  inhibition relative to this was plotted against the concentration of caffeine on a semi-log scale. Each data point is the mean of 4-9 experiments; vertical lines show mean  $\pm$  standard error (S. E.). The curve was fitted according to the Michaelis-Menten equation,  $I_{\text{Ca}} = 1 / \{1 + ([\text{caffeine}] / K_d)\}$ , with a  $K_d$  (dissociation constant) of 20 mM.

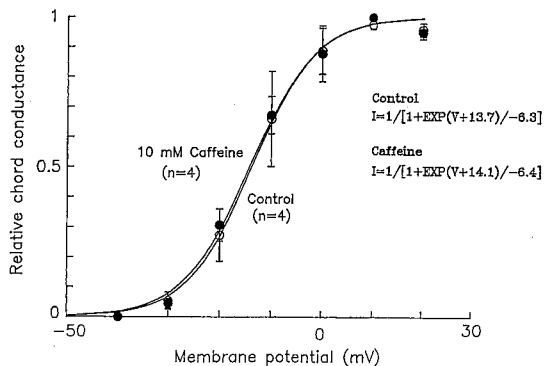


**Fig. 4** Time dependent effect of caffeine on  $I_{\text{Ca}}$ . Repetitive depolarizing pulses (150 ms duration) were applied at a frequency of 0.067 Hz from a holding potential of  $-60$  mV to  $+10$  mV. The mean amplitude of the peak  $I_{\text{Ca}}$  before applying caffeine was normalized to 1.0 and the relative amplitude of peak  $I_{\text{Ca}}$  in the presence of caffeine was plotted against the time. 10 mM caffeine was applied during the period indicated by the horizontal bar. Depolarizing pulse were stopped for 2 min after application of caffeine.

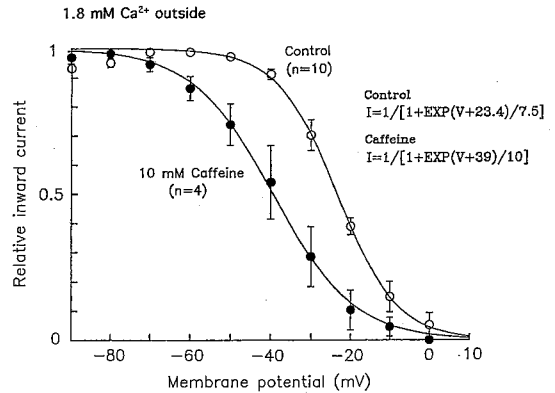
値を式  $I_{Ca} = g_{Ca}(E_m - E_{Ca})$  に代入し、弦コンダクタンスを求め、活性化曲線を描いた (Fig. 5). 活性化曲線はボルツマン関数にフィットし、half activation voltage は  $-13.7$  mV, slope factor は 6.3 であった. 外液に 10 mM のカフェインを投与し、4 分後、同様の刺激条件にて活性化曲線を求めた. カフェイン投与後の half activation voltage は  $-14.1$  mV, slope factor は 6.4 でカフェイン投与前後で有意な差はなく、カフェインは活性化曲線に影響を与えなかった.

### 3.6 定常状態不活性化曲線

カフェインの定常状態不活性化曲線に対する影響を調べた. 保持電位  $-80$  mV で、条件電位は 5 秒間とし、 $-90$  mV から  $+10$  mV まで 10 mV ステップで変化させた. 続けて  $+10$  mV の試験刺激を持続時間 100 ms で与え、電流を記録した.  $Ca^{2+}$  電流の定常状態不活性化曲線 (Fig. 6 ○) はボルツマン関数にフィットし、half inactivation voltage は  $-23.4$  mV, slope factor は 7.5 であった. 外液に 10 mM のカフェインを投与し、4 分後、同様の刺激条件にて定常状態不活性化曲線を求めた (Fig. 6 ●). カフェイン投与後の half inactivation voltage は  $-39$  mV, slope factor は 10 で、カフェイン



**Fig. 5** Steady-state activation curves for  $I_{Ca}$  in the presence (○) and absence (●) of 10 mM caffeine. Data with caffeine were obtained 3 min after application. Repetitive depolarizing pulses (300 ms duration) were applied at a frequency of 0.067 Hz from a holding potential of  $-60$  mV to  $+10$  mV. The activation curves were expressed by plotting the peak membrane conductance (calculated as peak current divided by the difference between membrane potential and apparent reversal potential) against voltage and fitted by a Boltzmann distribution:  $I = 1 / [1 + \exp((V_m - V_h)/k)]$  where  $V_m$  is the membrane potential,  $V_h$  is the half activation voltage and  $k$  is the slope factor of the curves. Each data point is the mean of 4 experiments; vertical lines show mean  $\pm$  S.E.

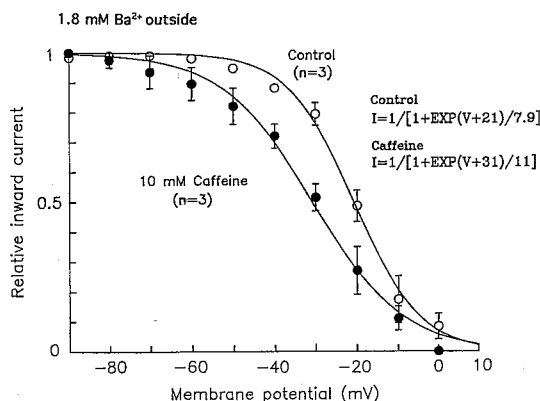


**Fig. 6** Steady-state inactivation curves for  $I_{Ca}$  in the presence (○) and absence (●) of 10 mM caffeine. Data with caffeine were obtained 4 min after application. The conventional two-pulse protocol was used: a 5 s conditioning pulse to various potentials applied to cells from holding potential of  $-90$  mV before stepping to a test potential of  $+10$  mV for 100 ms. The maximum amplitude of the peak  $I_{Ca}$  was normalized to 1.0. Each data point is the mean of 10 experiments (in the absence of caffeine) and 4 experiments (in the presence of 10 mM caffeine); vertical lines show mean  $\pm$  S.E. Inactivation curves were fitted by a Boltzmann distribution:  $I = 1 / [1 + \exp((V_m - V_h)/k)]$  where  $V_m$  is the membrane potential,  $V_h$  is the half inactivation voltage and  $k$  is the slope factor of the curves.

は  $Ca^{2+}$  電流の定常状態不活性化曲線を 15.6 mV 負電位側にシフトさせた. ラット培養妊娠子宮平滑筋細胞<sup>8)</sup> やウサギ耳介動脈平滑筋細胞<sup>9)</sup> で、カフェインは  $Ba^{2+}$  をチャージキャリアとした定常状態不活性化曲線をシフトさせないことが報告されている. そこで、チャージキャリアを  $Ba^{2+}$  に置き換えて同様の刺激条件で電流を記録し、定常状態不活性化曲線を描いた (Fig. 7). カフェイン投与前 (Fig. 7 ○) の half inactivation voltage は  $-21.0$  mV, slope factor は 7.9 であった. カフェイン投与後 (Fig. 7 ●) の half inactivation voltage は  $-31.0$  mV, slope factor は 11 であり、カフェインは  $Ba^{2+}$  電流の定常状態不活性化曲線も有意に負電位側へシフトさせた.

### 3.7 $Ca^{2+}$ 電流に対する cAMP の作用

カフェインは、フォスホジエステラーゼ阻害作用により細胞内 cAMP 濃度を上昇させることが知られている<sup>11)</sup>. そこでカフェインによる  $Ca^{2+}$  電流の抑制が、cAMP の作用に起因するものかどうかを調べた.  $-60$



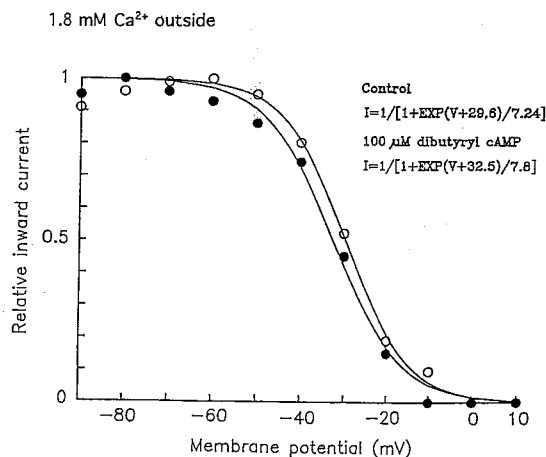
**Fig. 7** Steady-state inactivation curves for  $I_{\text{Ba}}$  recorded in 1.8 mM  $\text{BaCl}_2$  Tyrode's solution in the presence (○) and absence (●) of 10 mM caffeine. Data with caffeine were obtained 4 min after application. The double pulse protocol was the same as Fig. 6. Each data point is the mean of 3 experiments; vertical lines show mean  $\pm$  S.E.. Inactivation curves were fitted by a Boltzmann distribution. (Parameters for inactivation curves were the same as described in Fig. 6.)

mV から +10 mV までの脱分極刺激を、持続時間 300 ms, 0.067 Hz の刺激頻度で繰り返し与えた。100  $\mu\text{M}$  8-bromo cAMP 投与により、 $\text{Ca}^{2+}$  電流の抑制はみられなかった (Fig. 8A)。細胞外液に 10 mM のカフェインを投与し、約 20% の抑制率を得た後、さらに 100

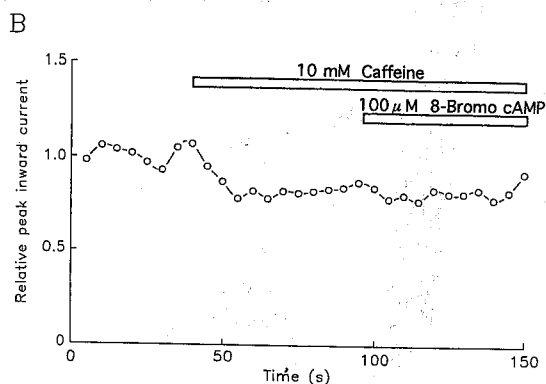
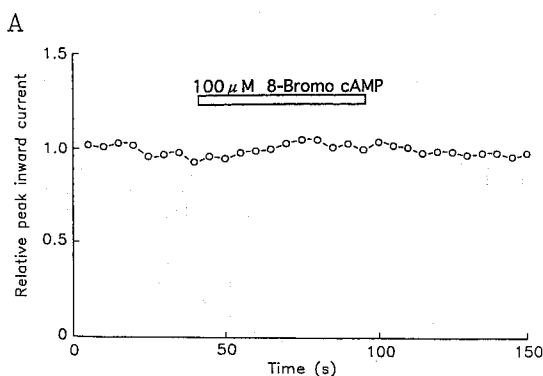
$\mu\text{M}$  8-bromo cAMP を付加した。 $\text{Ca}^{2+}$  電流に対する加算的抑制効果は得られなかった (Fig. 8B)。

### 3.8 定常状態不活性化曲線に対する cAMP の作用

心筋では、細胞内 cAMP 依存性蛋白キナーゼによって L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが磷酸化されると、定常状態不活性化曲線が負電位側にシフトするという報告がある<sup>14)</sup>。そこでカフェインによる定常状態不活性化曲線のシフ



**Fig. 9** Steady-state inactivation curves for  $I_{\text{Ca}}$  in the presence (○) and absence (●) of 100  $\mu\text{M}$  8-bromo cAMP. Data with caffeine were obtained 5 min after application. The double pulse protocol was the same as in Fig. 6. Inactivation curves were fitted by a Boltzmann distribution. (Parameters for inactivation curves were the same as described in Fig. 6.)



**Fig. 8** Effect of 8-bromo cAMP (100  $\mu\text{M}$ ) on  $I_{\text{Ca}}$  in single isolated smooth muscle cells of guinea-pig urinary bladder. Repetitive depolarizing pulses (150 ms duration) were applied at a frequency of 0.067 Hz from a holding potential of  $-60$  mV to  $+10$  mV. **A**: 100  $\mu\text{M}$  8-bromo cAMP was applied during the period indicated by the horizontal bar. The mean amplitude of the peak  $I_{\text{Ca}}$  before application of 8-bromo cAMP was normalized to 1.0, and the amplitude relative to this was plotted against the time. **B**: Effect of 100  $\mu\text{M}$  8-bromo cAMP in the presence of 10 mM caffeine. The mean amplitude of the peak  $I_{\text{Ca}}$  before application of drugs was normalized to 1.0, and the amplitude relative to this was plotted against the time. Superfusion by drugs are indicated by horizontal bar.

トが、cAMPの作用によるかどうかを調べた。100  $\mu$ M 8-bromo cAMP投与前後で定常状態不活性化曲線を比較した。8-bromo cAMP投与前のhalf inactivation voltageは-29.6 mV, slope factorは7.24であった。8-bromo cAMP投与後のhalf inactivation voltageは-32.5 mV, slope factorは7.8であり、定常状態不活性化曲線は8-bromo cAMP投与により有意なシフトを示さなかった (Fig. 9)。

## 4 考 察

### 4.1 カフェインによる $\text{Ca}^{2+}$ 電流の一過性抑制

カフェイン投与により、 $\text{Ca}^{2+}$ 電流は2相性に抑制された (Fig. 2A, B)。投与直後にみられる一過性の抑制は、細胞内EGTA濃度が低い場合 (0.5 mM以下)にのみ観察された。さらに、 $\text{Ca}^{2+}$ 電流の一過性の抑制は、高濃度EGTA (20 mM)や、 $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵部位からの $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を抑制するブロカイン<sup>3)</sup>を細胞内に添加すると消失した (Fig. 2C, D)。このことから、カフェインによる $\text{Ca}^{2+}$ 電流の一過性の抑制は、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵部位からの $\text{Ca}^{2+}$ 遊離による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇に基づくものと考えられる。 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルは細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇により不活性化を受けることが知られている ( $\text{Ca}^{2+}$ 依存性不活性化<sup>15)</sup>)。したがって $\text{Ca}^{2+}$ 電流の一過性抑制は、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵部位からの $\text{Ca}^{2+}$ 遊離による $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルの $\text{Ca}^{2+}$ 依存性不活性化によると結論することができる。カフェイン投与時に細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が一過性に上昇することは、Indo-1を用いた膀胱平滑筋細胞の $\text{Ca}^{2+}$  transientの測定 (Schneiderら<sup>16)</sup>)によって明らかにされており、本実験でみられた $\text{Ca}^{2+}$ 電流の一過性抑制の時間経過とよい対応を示している。

### 4.2 カフェインによる $\text{Ca}^{2+}$ 電流の持続的抑制

カフェイン投与後半部の $\text{Ca}^{2+}$ 電流の持続的抑制は、細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 緩衝能力を種々に変えた条件下でも観察される。細胞内EGTA濃度が0.5 mM, 20 mMの場合、 $\text{Ca}^{2+}$ 電流の抑制率はおおの26.5 $\pm$ 4.7%, 24.6 $\pm$ 3.5%であり、有意差は認められなかった。さらに0.5 mM EGTAにブロカイン、ヘパリンを加えた場合の抑制率は29.2 $\pm$ 4.3%で、0.5 mM EGTA単独の場合と比べ有意な差はみられなかった (Table 1)。このことから、後半部にみられる $\text{Ca}^{2+}$ 電流の持続的抑制は、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度とは無関係であることがわかる。本実験ではカフェイン投与後半部にみられる $\text{Ca}^{2+}$ 電流の持続的抑制のメカニズムについて、電流-電圧関係、定常状態活性化および定常状態不活性化の性質を指標にして検討を行った。カフェインは電流-電圧曲線の

閾値、ピーク電位、逆転電位を変えずに $\text{Ca}^{2+}$ 電流を抑制した (Fig. 1c)。このことは、カフェインは表面電荷に影響を与えずに $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルのコンダクタンスを減少させて電流を抑制する事を示す。カフェインの投与前後で定常状態不活性化曲線を比較すると、カフェインは $\text{Ca}^{2+}$ 電流の定常状態不活性化曲線を負電位側にシフトさせる事がわかった (Fig. 6)。カフェインによる定常状態不活性化曲線のシフトは、チャージキャリアを $\text{Ba}^{2+}$ にしてもみられた (Fig. 7)。このことは、膀胱平滑筋の $\text{Ca}^{2+}$ 電流に対するカフェインの抑制作用が電位依存性であることを示す。 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルは静止状態、活性化状態、不活性化状態の3つの状態を取り得る。この3状態と薬物の作用発現とは密接な関係にあることが報告されている。 $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗薬のうち、ベラパミル、ジルチアゼムは、平滑筋 $\text{Ca}^{2+}$ 電流を主に使用一頻度依存性に抑制することから、これら薬物は $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルの活性化状態に結合して抑制作用を発揮すると考えられている。一方、ニカルジピン (DHP誘導体 $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗薬)は使用一頻度依存性を示さず電位依存性を示すことから、チャンネルの不活性化状態に主に結合して抑制作用を発揮すると考えられている<sup>17)</sup>。カフェインの膀胱平滑筋 $\text{Ca}^{2+}$ 電流に対する持続的抑制作用は、主に時間依存性 (Fig. 4)で且つ電位依存性 (Fig. 6)であることから、カフェインはDHP誘導体 $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗薬と同じように、不活性化状態の $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルに結合して抑制作用を発揮すると考えられる。Martinら<sup>8)</sup>は妊娠ラット子宮平滑筋単細胞で放射性リガンドを用いた結合実験を行い、カフェインが<sup>3</sup>H-isradipine (DHP誘導体)の結合に拮抗することを報告し、カフェインの $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルへの直接作用を示唆している。最近、DHPの結合部位は、従来考えられていたより膜の外側に存在することが報告された<sup>18)</sup>。カフェインの作用部位は単一チャンネル電流の測定によって今後明らかにする必要がある。ラット膀胱平滑筋細胞の形質膜ではアデノシン受容体 ( $\text{P}_1$ )の存在が報告されており<sup>19)</sup>、アデノシンの結合により弛緩作用を誘起することが知られている。カフェインはアデノシン受容体に結合し、セカンドメッセンジャーを介して $\text{Ca}^{2+}$ 電流を抑制している可能性も考えられる。しかし、プリン受容体にカフェインが単独で作用し、セカンドメッセンジャーを誘導するという報告は現在までない。又、100  $\mu$ M 8-bromo cAMPは $\text{Ca}^{2+}$ 電流を抑制しないこと (Fig. 9)から、カフェインの $\text{Ca}^{2+}$ 電流抑制作用はフォスフォジエステラーゼ阻害作用を介したものでないことが判明した。平滑筋 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルに対するcAMPの作用は、臓器により異



なる報告がなされているが、モルモット結腸紐<sup>20)</sup>、ウサギ回腸<sup>21)</sup>など内臓平滑筋では  $\text{Ca}^{2+}$  電流に影響を持たないことが報告されており、本実験結果もこれと一致する。

## 5 要 約

モルモット膀胱単離平滑筋細胞に whole-cell patch clamp 法を適用し、 $\text{Ca}^{2+}$  電流に対するカフェインの抑制作用について精査し、以下の結果を得た。

(1) カフェインによる  $\text{Ca}^{2+}$  電流の抑制は、投与直後の大きな一過性抑制と、投与後半部にみられる持続的抑制の二相からなる。

(2) カフェイン投与直後にみられる  $\text{Ca}^{2+}$  電流の一過性の抑制は、細胞内に高濃度 EGTA やプロカインを加えると消失する。

(3) カフェイン投与後半部にみられる  $\text{Ca}^{2+}$  電流の持続的な抑制は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に無関係である。この  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性のカフェインによる  $\text{Ca}^{2+}$  電流の抑制様式について以下の事が判明した。

(4) カフェインは、電流-電圧曲線の閾値、ピーク電位、逆転電位を変えずに  $\text{Ca}^{2+}$  電流を抑制した。

(5) カフェインは、時間依存性に且つ濃度依存的に  $\text{Ca}^{2+}$  電流を抑制し、 $K_d$  は 20 mM であった。

(6) カフェインは、 $\text{Ca}^{2+}$  電流の定常状態活性化曲線に影響を与えなかった。一方、カフェインは、 $\text{Ca}^{2+}$  電流の定常状態不活性化曲線を 15.6 mV 負電位側へシフトさせた。このシフトはチャージキャリアを  $\text{Ba}^{2+}$  に置換してもみられた。

(7) 100  $\mu\text{M}$  8-bromo cAMP は、 $\text{Ca}^{2+}$  電流を抑制せず、 $\text{Ca}^{2+}$  電流の定常状態不活性化曲線にも影響を与えなかった。

以上の結果より、以下の結論を得た。

(a) カフェインは投与直後に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位から  $\text{Ca}^{2+}$  を遊離させ、 $\text{Ca}^{2+}$  電流を  $\text{Ca}^{2+}$  依存性不活性化により一過性に抑制する。(b) カフェインは  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを直接作用により抑制し、その抑制様式は非使用依存性、時間依存性且つ電位依存性で、DHP 誘導体  $\text{Ca}^{2+}$  拮抗薬類似の作用を持つ。(c) カフェインによる  $\text{Ca}^{2+}$  電流の抑制は、フォスフォジエステラーゼ阻害作用と無関係である。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただきました札幌医科大学第1生理学講座薮英世教授に深謝するとともに、研究に際し、御教示、御助言いただきました同学外科学第2講座小松作蔵教授に深謝致します。

また、御協力いただいた教室員各位、動物実験施設部員各位に感謝致します。

## 文 献

1. Chen Q, van Breemen C. Function of smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1992, 26: 335-350
2. Endo M. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev* 1977, 57: 71-108
3. Iino M. Calcium-induced calcium release mechanism in guinea pig taenia caeci. *J Gen Physiol* 1989, 94: 363-383
4. Benham CD, Bolton TB. Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit. *J Physiol* 1986, 381: 385-406
5. Zholos AV, Baidan LV, Shuba MF. Properties of the late transient outward current in isolated intestinal smooth muscle cells of the guinea-pig. *J Physiol* 1991, 443: 555-574
6. Baron A, Pacaud P, Loirand G, Mironneau C, Mironneau J. Pharmacological block of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflügers Arch* 1991, 419: 553-558
7. Zholos AV, Baidan LV, Shuba MF. The inhibitory action of caffeine on calcium currents in isolated intestinal smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 1991, 419: 267-273
8. Martin C, Dacquet C, Mironneau C, Mironneau J. Caffeine-induced inhibition of calcium channel current in cultured smooth muscle cells from pregnant rat myometrium. *Br J Pharmacol* 1989, 98: 493-498
9. Hughes AD, Hering S, Bolton TB. The action of caffeine on inward barium current through voltage-dependent calcium channels in single rabbit ear artery cells. *Pflügers Arch* 1990, 416: 462-466
10. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981, 391: 85-100
11. Ahn HY, Karaki H, Urakawa N. Inhibitory effects of caffeine on contractions and calcium movement in vascular and intestinal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1988, 93: 267-274
12. Kura H, Yoshino M, Yabu H. Blocking action

- of Terodiline on calcium channels in single smooth muscle cells of the guinea pig urinary bladder. *J Pharmacol Exp Ther* 1992, 261: 724-729
13. Isenberg G, Klöckner U. Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflügers Arch* 1982, 395: 6-18
14. Tiaho F, Nargeot J, Richard S. Voltage-dependent regulation of L-type cardiac Ca channels by isoproterenol. *Pflügers Arch* 1991, 419: 596-602
15. Ohya Y, Kitamura K, Kuriyama H. Regulation of calcium current by intracellular calcium in smooth muscle cells of rabbit portal vein. *Circ Res* 1988, 62: 375-383
16. Schneider P, Hopp HH, Isenberg G.  $\text{Ca}^{2+}$  influx through ATP-gated channels increments  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and inactivates  $I_{\text{Ca}}$  in myocytes from guinea-pig urinary bladder. *J physiol* 1990, 440: 479-496
17. Terada K, Kitamura K, Kuriyama H. Blocking actions of  $\text{Ca}^{2+}$  antagonists on the  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the smooth muscle cell membrane of rabbit small intestine. *Pflügers Arch* 1987, 408: 552-557
18. Nakayama H, Taki M, Striessing J, Glossmann H, Catterall WA, Kanaoka Y. Identification of 1, 4-dihydropyridine binding regions with in the  $\alpha_1$  subunit of skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  channels by photoaffinity labeling with diazepam. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88: 9203-9207
19. Nicholls J, Hourani SMO, Kitchen I. Characterization of  $\text{P}_1$ -purinoceptors on rat duodenum and urinary bladder. *Br J Pharmacol* 1992, 105: 639-642
20. 臼木俊洋. モルモット結腸紐平滑筋電位依存性カルシウムチャネルに対するタンパク質キナーゼ活性化剤, 阻害剤およびタンパク質フォスファターゼ阻害剤の影響. *札幌医誌* 1991, 60: 31-41
21. Ohya Y, Kitamura K, Kuriyama H. Modulation of ionic currents in smooth muscle balls of the rabbit intestine by intracellularly perfused ATP and cyclic AMP. *Pflügers Arch* 1987, 408: 465-473

---

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学医学部第1生理学講座 松藤弥生